Комекбай М.С., Шабдарбаева Г.С.

ІРІ ҚАРА МАЛ ТЕЙЛЕРИОЗЫН ДИАГНОСТИКАЛАУ МАҚСАТЫНДА ЖЕТІЛДІРУ

Аңдатпа

Мақалада ірі қара малдың тейлериозын диагностикалаудың жаңа әдісін әзірлеу бойынша зерттеулердің нәтижелері келтірілді, жануарлардың қан сарысуын зерттеуді қоса алғанда, бұл зерттеу жанама иммунофлуоресценцияның антиген ретінде эритроциттердің тұрақтандырылған диагностикасын қолдану арқылы қойылым реакциясы арқылы жүзеге асуымен сипатталады, люминесценцияның болуы немесе болмауы негізінде тиісті диагноз жасалады. Ірі қара мал тейлериозын диагностикалау әдісі бірқатар артықшылықтарға ие, оның бастысы - зерттеудің сенімділігін арттыру.

Кілт сөздер: Тейлериоз, трансмиссиялық ауру, тасымалдаушы, трансациальды трансмиссия, анемия, сарғаю, спленмегалия, серологиялық сынақтар, еритін және корпускулярлық антигендер, комплементар, сарысу, эритроциттердің диагностикасы, сенситин, сенсибилизация.

Komekbai M., Shabdarbaeva G.

IMPROVEMENT OF DIAGNOSIS OF TAYLERIOSIS OF LARGE CATTLE

Annotation

The article presents the results of studies on the development of a new method for diagnosing bovine theileriosis, which includes the study of blood serum of animals, characterized by the fact that the study is performed by the reaction of indirect immunofluorescence on a slide with the use of a stabilized erythrocyte diagnostic as an antigen, based on the presence or absence of luminescence the corresponding diagnosis. The method of diagnosis of cattle theilerosis has a number of advantages, the main one of which is an increase in the reliability of the study.

Key words: Taylorios, transmissible disease, vector, transfacial transmission, anemia, icterus, splenmegalia, serological tests, soluble and corpuscular antigens, complement, serum, erythrocyte diagnostician, sensitin, sensitization.

УДК: 619:616.99

Кыдыров Т., Абилхамитов Б., Шабдарбаева Г., Ахметсадыков Н.

НАО «Казахский национальный аграрный университет»

РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ТРИПАНОСОМОЗНЫХ АНТИГЕНОВ И СОПУТСТВУЮЩИХ КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ КОМПЛЕКТАЦИИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ НАБОРОВ

Абстракт

В процессе исследований разработаны и усовершенствованы технологические параметры получения наибольшего количества трипаносомной массы; приготовления специфического трипаносомного антигена; позитивной и негативной сывороток; сформирован «Набор биокомпонентов для тест-системы при су-ауру», в который входят 2

флакона трипаносомного антигена, 2 флакона разбавителя, 2 флакона позитивной сыворотки и 2 флакона негативной сыворотки. Набор апробирован на предприятии и в Республиканской ветеринарной лаборатории, внесен в государственный реестр ветеринарных препаратов, разрешенных на территории Казахстана.

Ключевые слова: Трипаносомоз, су-ауру, сыворотка крови, инвазированная кровь, мазки крови, штамм, активность, специфичность, стандарт GMP, серологическая диагностика, тест-системы.

Актуальность

Трансмиссивные инвазионные болезни, в частности, трипаносомоз (су-ауру), характеризуются изнуряющей перемежающейся лихорадкой, анемией, желтухой, гемоглобинурией, нарушением пищеварительной, сердечно-сосудистой, нервной, двигательной систем, снижением всех видов продуктивности, сильным исхуданием, вплоть до кахексии, большим процентом летальности. Распространение болезни колеблется от 15 до 50 % [1,2]. Кроме того, трипаносомоз является сертифицируемым заболеванием при ввозе и вывозе животных, что еще более усиливает важность проблемы своевременной и качественной диагностики. Диагностические наборы, основанные на использовании низкочувствительных тестов, таких как реакция преципитации (РП), реакция агглютинации (РА), реакция желефекации (РЖ), реакция связывания комплемента (РСК) и другие, не позволяют достоверно и своевременно поставить диагноз на трипаносомоз [3,4]. В то же время, разработанные за рубежом наборы по ИФА-диагностике являются дорогостоящими, созданными без учета биологических особенностей местных штаммов возбудителя су-ауру. Поэтому Казахстан вынужден использовать для диагностики сертифицируемого инвазионного заболевания - трипаносомоза тест-системы, закупая их за рубежом. Разработанные за рубежом наборы по ИФА-диагностике являются дорогостоящими, созданными без учета биологических особенностей местных штаммов возбудителей болезней. Поэтому выпуск отечественных наборов, созданных на основе местных штаммов возбудителя является актуальной и своевременной задачей, позволит решить проблему импортозамещения, наладить биологически безопасных диагностических препаратов нового поколения, создать предприятие по производству биопрепаратов.

Материал и методы

Исследования проводились в отделе паразитологии ТОО «Научно-производственное предприятие «Антиген» Метрологическое обеспечение приборов и оборудования проводилось Казахским центром стандартизации и метрологии. При накоплении паразитарной массы использованы клинические, паразитологические (микроскопические) методы, а также биологическая проба и поддержание штамма *Trypanosoma evansi* на лабораторных животных (белых мышах, морских свинках, кроликах, собаках) и на близкородственных крупных животных (ослах, беспородных лошадях, верблюжатах). Штамм поддерживался методом многократных пассажей на лабораторных и с/х животных путем инъекции инвазированной паразитами крови с трилоном-Б подкожно и внутрибрюшинно. Адаптация полевого штамма *Trypanosoma evansi* и усиление его вирулентности было проведено применением различных депрессантов. Микроскопическими методами исследовалась динамика появления трипаносом в периферической крови экспериментально зараженных лабораторных животных. На высоте паразитемии зараженные трипаносомами лабораторные животные обескровливались тотально, а с/х животные – порционно (частично). Для накопления паразитарной массы трипаносом, отделения трипаносом от компонентов биоптантов применялись разработанные на предприятии и защищенные охранными документами РК способы [24,25]. Для получения гипериммунной (положительной) сыворотки были

использованы лошади, ослы и кролики. Негативная сыворотка получена от заведомо здоровых животных - молодняка до года и не имевших контакта с переносчиками.

Результаты исследований

Эффективность серологических методов диагностики целиком зависит от качества применяемых для исследований специфических антигенов – иммунодиагностикумов. Залогом же успешного конструирования иммунодиагностикумов является получение очищенных антигенов. Существующие на настоящее время методы получения антигенов из крови зараженных животных несовершенны, т.к. антигены имеют значительное количество балластных веществ, аллотипов и изотипов. При исследованиях отработаны некоторые параметры приготовления корпускулярных и растворимых антигенов из крови спонтанно и экспериментально зараженных животных на модели - трипаносомоз.

Самым начальным этапом приготовления антигенов при кровепаразитозах было приготовление так называемого «нормального антигена», т.е. антигена из незараженной крови, который использовался для очистки антигенов, приготовленных из зараженной крови, для извлечения из них балластных веществ, таких как строма эритроцитов, аллотипы и изотипы и для контроля степени сорбции антиидиотипических антител. Для этого до экспериментального заражения трипаносомами брали у животных кровь, из которой готовили т.н. «нормальный антиген» по методу Н.И.Степановой, консервировали мертиолятом натрия и хранили в холодильнике при температуре +4°С.

При приготовлении корпускулярных антигенов вначале заражали животных штаммами трипаносом, полученными от спонтанно зараженных животных в полевых условиях. Для этого животным вводили внутримышечно или внутрибрюшинно по 20 мл зараженной крови с трилоном-Б. За всеми опытными животными вели клинический и микроскопический контроль. После появления кровепаразитов в периферической крови ежедневно брали мазки крови, изучая паразитемию. На высоте паразитемии, равной приблизительно 60 – 80% животных брали кровь и заражали новые партии белых мышей. Такой пассаж через лабораторных животных проводится для поддержания штамма трипаносом постоянно. Лабораторных животных после взятия от них крови для заражения новых партий мышей, обескровливали тотально, собирая кровь с трилоном-Б в специальные емкости и готовили из инвазированной крови специфический корпускулярный трипаносомный антиген. Проверяли активность и специфичность приготовленных антигенов из крови в РСК с заведомо положительными и отрицательными сыворотками. Приготовление так называемого «нормального антигена» и специфических корпускулярных антигенов на модели «трипаносомоз» защищены охранными документами РК. Приготовленные нами «нормальные антигены» фиксировали мертиолятом натрия, этикетировали и хранили в холодильнике при температуре +4°С. Для стабилизации часть антигена лиофилизировали в рабочем титре с защитной средой. Перед употреблением антиген растворяли в физиологическом растворе. Всего приготовлено т.н. «нормальных антигенов» по 5 серий от каждого вида животных, которых впоследствии использовали для заражения специфическим возбудителем болезни и получения антигенов. Приготовленные нами «нормальные антигены» проверялись на стерильность, специфичность с заведомо отрицательными и заведомо положительными сыворотками крови от экспериментально зараженных соответствующей инвазией животных. Все приготовленные нами серии т.н. «нормального антигена» из крови животных до начала заражения трипаносомами при проверке на специфичность с заведомо отрицательными и заведомо положительными сыворотками крови от экспериментально зараженных трипаносомозом животных во всех случаях дали отрицательные результаты (таблица 1). В дальнейшей нашей работе приготовленные нами т.н. «нормальные антигены» были стабилизированы различными способами и использовались в качестве составных частей при приготовлении различных вариантов иммуносорбентов, которые применялись в

процессе получения идиотипов и антиидиотипов для иммунохимической очистки антител и для контроля степени сорбции идиотипических и антиидиотипических антител.

Таблица 1 - Результаты РСК при контрольном исследовании «нормального антигена» при трипаносомозе лошадей

Сыворотка крови	Серии антигенов и титр антител				
	№1	№2	№3	№4	№5
Положительная – *Trypanosoma evansi*	–	–	–	–	–
Отрицательная	–	–	–	–	–

Затем готовили корпускулярные антигены из крови экспериментально зараженных трипаносомами (*Trypanosoma evansi*) белых мышей, собак и однокопытных, зараженных трипаносомозом. Чаще материалом для получения трипаносомного антигена служила кровь собак, зараженных эталонным штаммом трипаносом. Собак заражали внутрибрюшинно в среднюю треть живота вблизи белой линии живота, вводя 40 – 50 мл цитратной крови (сборной крови от 4 – 5 крыс), в зависимости от размеров собаки. Контролировали микроскопическими методами нарастание паразитемии. На 2 - 3 день заражения у собак в периферической крови появляются трипаносомы, количество которых периодически нарастает или уменьшается.

Зараженных собак обескровливали в момент первого накопления трипаносом, когда при микроскопическом исследовании крови их было не менее 80 в одном поле зрения микроскопа. Обескровливание проводили путем взятия крови из сонной артерии с помощью стилета. При этом всю вытекающую струей кровь собирали в широкий сосуд с 2%-ным цитратом натрия на физиологическом растворе при постоянном помешивании стеклянной палочкой, из расчета 1 часть крови и 2 части раствора.

Полученную цитратную кровь фильтровали через двойной марлевый фильтр в стерильные банки, которые затем помещали в холодильник при температуре +4°С на 24 часа. Отстоявшийся цитрат и плазму отсасывали шприцом в отдельную банку, а осадок тщательно размешивали и подвергали центрифугированию. Центрифугирование производили в предварительно прокипяченных стаканчиках емкостью 80 – 100 мл в течение 15 – 20 минут при 3000 об/мин.

В результате центрифугирования в стаканчике образуется три слоя: верхний – прозрачный, желтоватый, состоящий из плазмы и цитрата; нижний – форменные элементы крови, а на границе между ними – средний, в виде толстой рыхлой массы белого цвета, состоящий из трипаносом.

Верхний слой сливали в банку, а трипаносомозную массу вынимали при помощи стеклянной палочки или шпателя и переносили в отдельную стерильную посуду. Всю собранную трипаносомную массу отмывали трехкратно в физиологическом растворе по 10 минут при 5000 об/мин. Далее производили градуированную дезинтеграцию трипаносом, переводя в растворимое состояние.

Дезинтеграцию осуществляли в поле ультразвуковых волн низкочастотного диспергатора УЗДН-2, градуированно, в три приема: первые две обработки проводили в физиологическом растворе, последнюю – основную, в дистиллированной воде. В стеклянный сосуд с водяным охлаждением вносили 2 г отмытых трипаносом, заливали 100 мл физиологического раствора и разрушали трипаносом на аппарате УЗДН-2 при 22 – 35 КГц в течение 10 мин. Взвесь частично разрушенных трипаносом центрифугировали

при 8000 об/мин в течение 15 минут. Надосадочную жидкость, т.е. лизат №1, сливали, а к осадку прибавляли 100 мл физиологического раствора и повторяли обработку трипаносом при частоте 22 – 35 КГц, по мощности 50 – 75 вт/см^2 в течение 30 минут. Взвесь разрушенных трипаносом центрифугировали при 8000 об/мин. в течение 15 минут.

Надосадочную жидкость, т.е. лизат №2, представляющую собой солерастворимую протоплазматическую часть трипаносом, отделяли от осадка оболочек трипаносом, которыую промывали в дистиллированной воде 3-х кратным центрифугированием при режиме 8000 об/мин. Отмытый осадок ресуспендировали в 30 мл дистиллированной воды, доводили pH до 8,0 – 8,2 с помощью 0,5 нормального раствора едкого натра, переносили в сосуд для озвучивания и обрабатывали ультразвуком с частотой 22 – 35 КГц, мощностью 40 – 60 вт/см^2 в течение 10 минут. Затем смесь подвергали центрифугированию при 8000 об/мин в течение 15 минут.

Полученная надосадочная жидкость – водный раствор оболочек трипаносом, т.е. лизат №3, является материалом для получения специфического трипаносомозного антигена. Далее мы проводили ультразвуковое изоионное фокусирование и выделение специфической антигенной фракции нижеследующим образом. Фракционирование ультразвукового лизата №3 начинали с фокусирования балластных фракций, которые обычно содержатся в лизате при недостаточно полной предварительной очистке трипаносом и недостаточно тщательном градуированном разделении трипаносом ультразвуком на лизат №3 и неспецифические протоплазматические лизаты №№1, 2. Для этого лизат №3 переносили в химический стакан на 100 мл, подвергали 3-х минутному воздействию ультразвука частотой 22 – 35 КГц и мощностью 50 – 75 вт/см^2, без применения охлаждающей системы, что приводит к быстрому прогреванию обрабатываемой среды до оптимальной для последующего фракционирования температуры 35 – 40°С. Электрометрическим титрованием с помощью pH метра и 0,5 – 1,0 N раствора едкого натра лизат №3 подщелачивали до pH 10,5 – 11,5, в пределах которых фокусируется в виде хлопьев антигенная «фракция А». Лизат выдерживали при 37°С в течение 30 минут, а сформировавшийся осадок отделяли 20 минутным центрифугированием при 8000 об/мин.

Надосадочную жидкость, т.е. лизат №4 обрабатывали ультразвуком при медленной нейтрализации 0,5 – 1,0 N раствором серной кислоты до pH 9,0 – 9,5. Лизат выдерживали 30 минут и отделяли центрифугированием «фракцию Б».

Аналогичным образом при pH 6,8 – 7,2 обрабатывали лизат №5 и получали «фракцию В», затем аналогичным изоионным фракционированием при pH 3,5 – 5,5 выделяли специфическую антигенную «фракцию Д». После центрифугирования специфическую «фракцию Д» растворяли в 30 мл дистиллированной воды при pH 8,0 – 8,2.

Завершающим этапом было приготовление и стандартизация трипаносомозного антигена. Полученный ранее раствор антигенной «фракции Д» является специфическим трипаносомозным антигеном. Стандартизацию антигена проводили по серологической активности титрацией с гипериммунными трипаносомозными сыворотками.

Оптимальный рабочий титр антигена в РСК 1:160 – 1:200, а в РП в агаровом геле – исходное разведение.

Чувствительность трипаносомозного антигена по обнаружению специфических трипаносомозных антител в сыворотке крови гипериммунных, экспериментально зараженных и спонтанно больных животных характеризуется в РСК в разведении сыворотки 1:5 - 1:640, а в РП в агаровом геле – одной линией преципитации. Для стабилизации антиген лиофилизировали в рабочем титре с защитной средой. Перед употреблением антиген растворяли в физиологическом растворе.

Результаты изучения нескольких серий приготовленного нами из крови лошадей и ослов, зараженной *Trypanosoma evansi*, трипаносомного антигена на чувствительность и специфичность приведены в таблице 2.

Таблица 2 - Результаты РСК с трипаносомным антигеном при трипаносомозе лошадей

Серии антигенов	Титр антител								Отрицательная сыворотка
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:120	1:320	1:640	
1	#	#	#	#	#	++	+	–	–
2	#	#	#	#	#	#	+++	++	–
3	#	#	#	#	#	#	#	++	–
4	#	#	#	#	#	#	#	+	–
5	#	#	#	#	#	#	#	++	–

Приготовленные серии антигенов из кровепаразита *Trypanosoma evansi* обладали неодинаковой чувствительностью, с заведомо положительными сыворотками давали титры антител в пределах от 1:80 до 1:160. Но в целом, все 5 серий приготовленных антигенов являются вполне информативными, достаточно активными для применения в серологических исследованиях. Приготовленные серии антигенов с заведомо отрицательными сыворотками крови давали во всех случаях отрицательный результат.

Рисунок 1 – Тотальное обескровливание подопытной собаки

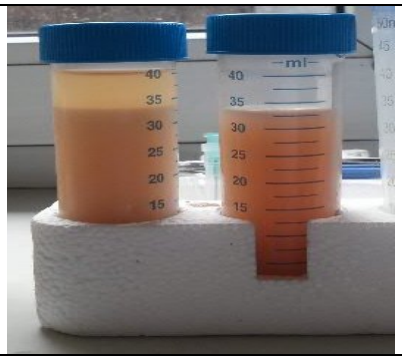

Рисунок 2 – Трипаносомная масса собранная от инвазионных животных

Рисунок 3 – Накопление паразитарной массы трипаносом для приготовления антигена

Для комплектации набора необходимы положительная (позитивная) сыворотка и отрицательная (негативная) сыворотка. Была отработана технология получения антитрипаносомозной (позитивной) сыворотки. Для получения антитрипаносомозной сыворотки вначале использовали ранее апробированные методы иммунизации животных, защищенные охранными документами: 1. Метод Fey et al., 1976), заключающийся в иммунизации кроликов-продуцентов антигеном в смеси с равным объемом полного адъюванта Фрейнда (ПАФ) 2. Метод А.М. Сафронова с соавт. (1976), заключающийся в иммунизации кроликов-продуцентов в 1-й день путем внутривенного введения антигена: сначала 0,002 мг белка, через 30 минут – 0,02 мг, и еще через 30 минут – 2 мг. 3. Метод Г. Фримеля (1987), заключающийся в сочетании внутримышечных и внутривенных инъекций антигена.

При иммунизации лабораторных животных антигеном из *Tr.evansi* по методу Fey et al. получен наивысший титр антител, который достигал к 12 - 18 дню после последней иммунизации 181 – 210 мкг/мл с постепенным равномерным снижением к 21 – 24 дню после иммунизации до 154 – 106 мкг/мл и к концу наблюдений, т.е. к 27 – 30 дню после последней инъекции антигена держался относительно стойко, снижался лишь до 78 – 30 мкг/мл.

При иммунизации лабораторных животных антигеном из *Tr.evansi* по методу Г.Фримеля и по Сафронову получали невысокие титры антител, в частности, ниже, чем при иммунизации по Fey et al. в 1,2 – 1,4 раз.

Поэтому с целью наработки большего количества антитрипаносомозной сыворотки, увеличения титра антител и удлинения сроков использования животных-продуцентов были испытаны разные варианты: изменение дозы антигена из *Tr.evansi*; разное сочетание способов введения антигена, введение иммунодепрессантов и др. В результате опытов была введена модификация в схему иммунизации животных, Она заключается в сочетанно-последовательном введении антигена из *Tr.evansi* подкожно, внутримышечно и внутривенно. Забор крови от иммунизированных животных предлагаемым способом также проводили через каждые 3 дня в течение 30 дней, с постоянным контролем титра антител.

Поставленная цель увеличения объема антитрипаносомной сыворотки, ее специфичности и активности была достигнута тем, что животных иммунизировали по следующей запатентованной схеме: 1-й день – антигеном, приготовленным из осадка дезинтеграта в смеси с равным объемом неполного адъюванта Фрейнда в подушечки лап кроликов, по 0,25 $см^3$ в каждую, подкожно в шести точках: слева и справа в область лопаток, центра спины и копчика, содержание белка должно быть не менее 5 $мг/см^3$, 7-й день – антигеном, приготовленным из дезинтеграта - внутримышечно, слева и справа в ягодичные мышцы – по 1,0 $см^3$ (20 мг белка); 14-й день – внутривенную иммунизацию антигеном, приготовленным из надосадочной части дезинтеграта по схеме: сначала 0,02 мг белка, через 30 минут – 0,2 мг, и еще через 30 минут – 20 мг.

Через 21 день данную манипуляцию повторяли. Забор крови начинали с 3-го дня после последней инъекции 1-го блока иммунизаций по 40-50 мл крови, трехкратно, с интервалом 72 часа. Повторно кровь брали, начиная с 3-го дня после внутривенной иммунизации, по той же схеме.

Далее цикл иммунизации и крововзятия повторяли по нескольку раз, используя животных продуцентов до 3-х и более месяцев (таблица 3).

Таблица 3 - Динамика антител к *Tr. evansi* при предлагаемой модифицированной схеме иммунизации лабораторных животных

Схема иммунизации	Титр антител, мкг/мл									
	Дни исследований после иммунизации									
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
Модифицированная схема	35	51	66	192	210	248	*	251	257	260
	Дни исследований после иммунизации									
	33	36	39	42	45	48	51	54	57	60
	261	247	243	*	259	263	230	319	320	319
	Дни исследований после иммунизации									
	63	66	69	72	75	78	81	83	87	90
	*	325	337	345	352	350	351	*	305	321
*Примечание: Дополнительная иммунизация										

В силу того, что предлагаемый метод предполагает многократное использование животных-продуцентов, с использованием феномена ревакцинации, специфическая активность получаемых сывороток должна значительно повышаться, что, соответственно, повышает эффективность и результативность диагностических тестов.

Чтобы убедиться в предполагаемом положительном эффекте, определить диагностические параметры сывороток полученные положительные сыворотки многократно апробированы на чувствительность и специфичность в реакции количественной преципитации (РКП) и в реакции связывания комплемента (РСК), в сравнении с сыворотками, полученными известными ранее способами (таблица 4).

Из таблицы 4 видно, что предлагаемый нами способ получения положительных сывороток в сравнении с известными позволяет получать диагностические сыворотки с более высокой специфической активностью и позволяет использовать животных продуцентов более длительное время, что снижает себестоимость сывороток.

Таблица 4 - Результаты изучения диагностических параметров антитрипаносомозных положительных сывороток, полученных разными способами

Способ иммунизации	Среднее количество дней эксплуатации	Результаты РКП (средний титр сывороток), мкг/мл
1. Модифицированный способ	125	360
2. Метод Fey et al.	31	240
3. Метод А.М. Сафронова с соавт.	35	220
4. Метод Г. Фримеля	32	260

Таким образом, в результате многократных исследований разработан способ получения иммунной сыворотки, применяемой при серологической диагностике трипаносомоза, который обеспечивает получение высокоактивных и высокоспецифичных сывороток с меньшими затратами и большим выходом целевого продукта, с более длительным сроком использования животных-продуцентов сывороток, что позволяет повысить достоверность серологических реакций и удешевить себестоимость конечного продукта. На способ получения антитрипаносомозной сыворотки получен патент РК.

Для полной комплектации набора для диагностики су-ауру необходима также негативная (отрицательная) сыворотка, которая используется при постановке контрольного опыта. Получение негативной сыворотки проводили следующим образом: подбирали из молодняка текущего года рождения жеребят с хорошей упитанностью, живой массой не менее 20-30 кг. Содержание животных было стойловое, исключающее их контакт с переносчиками трипаносомоза – слепнями. Перед каждым крововзятием у животных измеряли температуру тела. Кровь брали только при условии нормальной температуры тела продуцентов из расчета 16 $см^3$, крови на 1 кг живого веса. За 12-14 часов до крововзятия животных ставили на голодную диету с неограниченным водопоем. Кровь брали из яремной вены в области верхней трети шеи, соблюдая при этом все меры асептики и антисептики. Кровь от каждого животного собирали в отдельную стерильную бутыль. После крововзятия бутыль с кровью ставили в термостат на 1-2 часа при температуре 37°С (при комнатной температуре на 3-4 часа) для отделения сыворотки, затем помещали в наклонном положении в холодильник при температуре 2-8°С. На 3-и сутки, производили 1-ый слив сыворотки, на 4-5 сутки – 2-ой слив сыворотки. Сыворотку от каждой лошади консервировали отдельно допустимым консервантом и ставили на 10 дней при температуре 2-8°С, для отстаивания. Затем брали пробу сыворотки из каждой

бутыли и подвергали проверке на стерильность путем высевов на МПА, МПБ, МППБ под вазелиновым маслом и среду Сабуро. Через 10 суток при условии стерильности сыворотку декантировали и смешивали для составления серии. Под серией негативной сыворотки следует понимать количество препарата, смешанное в одной емкости, подвергнутое дальнейшей обработке в одних производственных условиях, расфасованное в ампулы или флаконы, получившее свой номер, номер госконтроля и оформленное одним документом о качестве. После смешивания сыворотку выдерживали 8-10 дней в холодильнике, а затем проверяли на стерильность. Сыворотка должна быть стерильной и не должна обладать антикомплементарными свойствами. После проверки сыворотку расфасовывали в ампулы или флаконы по 2 $см^3$, ампулы запаивали, а флаконы укупоривали пробками с алюминиевыми колпачками и этикетировали.

Формировали набор биокомпонентов для тест-системы при су-ауру, в который входят 2 флакона трипаносомного антигена, 2 флакона разбавителя, 2 флакона позитивной сыворотки и 2 флакона негативной сыворотки.

Заключение

В процессе исследований разработаны и усовершенствованы технологические параметры получения наибольшего количества трипаносомной массы; приготовления специфического трипаносомного антигена; позитивной и негативной сывороток; сформирован «Набор биокомпонентов для тест-системы при су-ауру», в который входят 2 флакона трипаносомного антигена, 2 флакона разбавителя, 2 флакона позитивной сыворотки и 2 флакона негативной сыворотки.

Литература

1 *Сабаншиев М.С.* Трипаносомозы животных (биологические свойства возбудителей, эпизоотология, пато- и иммуногенез, диагностика, меры борьбы): автореф. ... докт. биол. наук. - М., 1993. – С.45.

2 *Шабдарбаева Г.С., Ахметова Г.Д., Кожаков К.К., Хусаинов Д.М., Нургазина А.С., Абеуов Х.Б., Усмангалиева С.С.* Изучение эпизоотической ситуации по случной болезни лошадей в Алматинской области//Известия НАН РК. Серия аграрных наук 2014 г. №3. – Режим доступа: http://www.library.kz/.

3 *Ахметова Г.Д.* Трипаносома антигенін комплементті байланыстыру реакциясына пайдалану үшін трипаносомды полиглобулинінің жұмыс стандартты үлгісін жасау әдістері //Ізденістер, нәтижелер. – ҚазҰАУ. - Алматы, 2005. - №3. – С.72-74.

4 *Shabdarbaeva G., Nurgazina A., Kozhakov K., Akhmetsadykov N., Akhmetzanova M., Akhmetova G., Husainov D.* Extraction of anti-idiotipic antibodies at trypanosomosis of animals // Jornal of International Sceeientific Publication Agriculture and Food / Volume 2, ISSN 1314-8591 (Online), Bulgary, 2014. Published at: http://www.scientific-publications.net.

5 *Khalili K.H.* An investigation of dourine and isolation of Trypanosoma equiperdum in Iran//Arch. Inst. Razi. - 1973. - V. 25. - P. 69-72.

6 Способ диагностика су-ауру у верблюдов: А.С. 000139 СССР, МКИ А 61 в 10/00 (Т.С.Сайдулдин (СССР). - 4 с.

7 *Сайдулдин Т.С., Хамиев С.Х.* Серологическая диагностика су-ауру у верблюдов//Ветеринария. – 1984. - № 3. - С. 74-76.

8 Патент РК №27712 - «Способ получения трипаносомозного антигена»//Опубликовано в официальном бюллетене РК «Промышленная собственность» № 12 от 15.12.2015 г. (Шабдарбаева Г.С., Ахметсадыков Н.Н., Балгимбаева А.И., Хусаинов Д.М., Амиргалиева С.С., Турганбаева Г.Е., Ахметова Г.Д., Кожаков К.К.).

9. *Абилхамитов Б.Б., Шабдарбаева Г.С.* - Накопление паразитарной массы из трипаносом//Материалы Международной научно-практической конференции молодых

ученых «Научный взгляд молодых: поиски, перспективы, инновации в АПК», 6-7 апреля 2017 г., Алматы. С. 3-7.

10. Патент №31772 - Штамм трипаносом Trypanosoma evansi, используемый для изготовления специфического трипаносомного диагностикума в серологических реакциях//Зарегистрировано 22.12.2016 г. Опубликовано в официальном бюллетене РК «Промышленная собственность» №18 от 30.12.2016 г. (Шабдарбаева Г.С., Ахметсадыков Н.Н., Хусаинов Д.М., Ахметова Г.Д., Нургазина А.С., Кожаков К.К., Ахметжанова М.Н., Турганбаева Г.Е., Балгимбаева А.И.).

11. *Shabdarbayeva G., Akhmetsadykov N., Balgimbaeva A., Ibazhanova A., Kusainov D., Amirgaliyeva S., Turganbayeva G. and Kidirov T.* - SET FOR TRIPANOSOMOZ'S (SU-AURU) DIAGNOSTICS//International Journals of Advenced Research (IJAR)/ ISSN: 2320-5407. Int.Ady.Res. 5(8), 1709-1722. Article DOI: 10.21474/IYAR01/5235. DOI URL: http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/5235. P/ 1709-172

Кыдыров Т., Абилхамитов Б., Шабдарбаева Г., Ахметсадыков Н.

ДИАГНОСТИКАЛЫҚ БЕЛГІЛЕР ҮШІН ТРИПАНОЗОМОЗДЫҚ ТҰТЫНУШЫЛАРДЫ ЖӘНЕ ТОЛЫҚТЫРЫЛҒАН КОМПОНЕНТТЕРДІ ДАЙЫНДАУ ӘДІСТЕРІН ДАМЫТУ

Аңдатпа

Зерттеу барысында трипанозомдық массаның ең көп мөлшерін алудың технологиялық параметрлері әзірленді және жетілдірілді; арнайы трипаносома антигенін дайындау; оң және теріс қансарысуы; «Су-аура бар сынақ жүйесі үшін биокомпонент жиынтығы» құрылды, яғни құрамына 2 құты трипаносомды антиген, 2 құты сұйылтқыш, 2 құты оң қансарысуы және 2 құты теріс қансарысуы. Жинақ кәсіпорында және Республикалық ветеринариялық зертханада сынақтан өтті, Қазақстан аумағында рұқсат етілген ветеринарлы препараттардың мемлекеттік тізіліміне енгізілді.

Кілт сөздер: Трипаносомоз, су-ауру, қансарысуы, инвазияланған қан, қан штаммдары, белсенділік, ерекшелік, GMP стандарты, серологиялық диагностика, сынау жүйелері.

Kydyrov T., Abilhamitov B., Shabdarbaeva G., Ahmetsadykov N.

DEVELOPMENT OF METHODS OF PREPARATION OF TRIPANOSOMESE ANTIGENS AND ACCOMPANYING COMPONENTS FOR DIAGNOSTIC KITS

Annotation

In the process of research, technological parameters for obtaining the greatest amount of trypanosomal mass have been developed and improved; preparation of a specific trypanosome antigen; positive and negative sera; "A set of biocomponents for a test system with su-aura" is formed, which includes 2 vials of trypanosomal antigen, 2 vials of diluent, 2 vials of positive serum and 2 vials of negative serum. The kit has been approved at the enterprise and in the Republican Veterinary Laboratory, entered in the state register of veterinary drugs permitted in the territory of Kazakhstan.

Keywords: Trypanosomiasis, su-aura, serum, invasive blood, blood smears, strain, activity, specificity, GMP standard, serological diagnosis, test systems.